

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-69900

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/71
31/785

識別記号

A D U

庁内整理番号

9454-4C

9454-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平5-216059

(22) 出願日 平成5年(1993)8月31日

(71) 出願人 591265312

桜井 靖久

東京都杉並区永福3-17-6

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 000004086

日本化薬株式会社

東京都千代田区富士見1丁目11番2号

(72) 発明者 横山 昌幸

千葉県松戸市新松戸3-170、MBSハイ
ツB-20

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

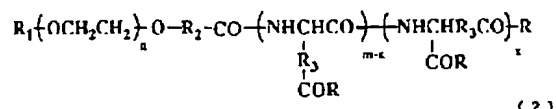
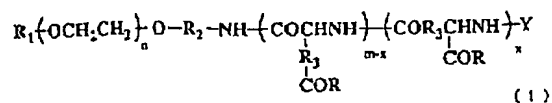
(54) 【発明の名称】 水溶性抗癌剤

(57) 【要約】

【目的】 ブロック共重合体と、アドリアマイシンの複合体からなる水溶性抗癌剤の抗癌活性の改良。

【構成】 式(1)、(2)またはこれらの塩の構造を有するブロック共重合体と、アドリアマイシンの複合体からなる水溶性抗癌剤。

【化1】



(R₁ は水素または低級アルキル基、R₂ は結合基、R₃ はメチレン基またはエチレン基、Y は水素または保護

基、R は水酸基またはアドリアマイシンの残基を表し、n は5~1, 000、m は2~300、x は0~300の整数を示すが、x はm より大きくない。)

【効果】 本発明の水溶性抗癌剤は、良好な水溶性を有し、しかも遊離のアドリアマイシンに比較して低い毒性の範囲でも高い抗腫瘍効果を示す。また、従来の水溶性高分子化抗癌剤に比べ、低い投与量で同等の抗癌活性を示すことより、本発明により極めて有用な医薬を提供できるものである。

1

2

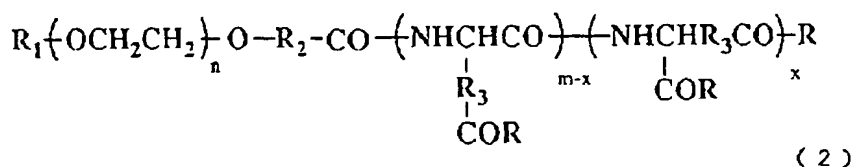
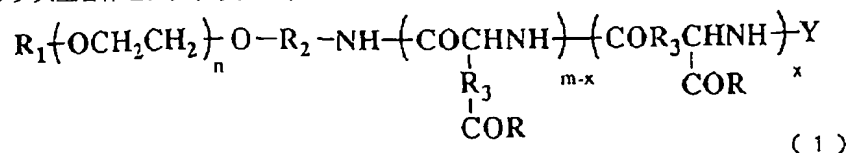
【特許請求の範囲】

* 複合体からなる水溶性抗癌剤。

【請求項1】 式(1)、(2)またはこれらの塩の構

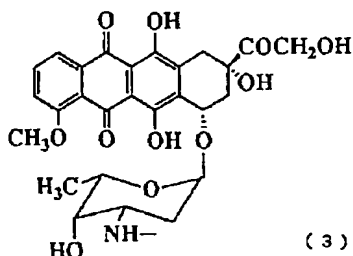
【化1】

造を有するブロック共重合体と、アドリアマイシンとの*



(式中、 R_1 は水素または低級アルキル基を表し、 R_2 は結合基を表し、 R_3 はメチレン基またはエチレン基を表し、 Y は水素または保護基を表し、また R はそれぞれ独立して水酸基または式(3)の構造を有するアドリアマイシンの残基を表すものとし、 n は5~1,000、 m は2~300、 x は0~300の整数を示すが、 x は m より大きくないものとする。)

【化2】



【請求項2】 ブロック共重合体が、ポリエチレングリコール構造部分を外側に、ポリアミノ酸またはその塩構造部分を内側とするミセルを形成し、ミセル内にアドリアマイシンを含有するものである請求項1記載の水溶性抗癌剤。

【請求項3】 R_1 がメチル基である請求項1または2記載の水溶性抗癌剤。

【請求項4】 R_2 が炭素数2~4のアルキレン基である請求項1、2または3記載の水溶性抗癌剤。

【請求項5】 R_3 がメチレン基である請求項1、2、

3または4記載の水溶性抗癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ブロック共重合体と、アドリアマイシンとの複合体からなる水溶性抗癌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 親水性高分子構造部分とアドリアマイシンを結合せしめた高分子構造部分とを有するブロック共重合体からなる水溶性高分子化抗癌剤については、特開平2-300133号公報に記載されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 特開平2-300133号公報に記載された方法によって得られる水溶性高分子化抗癌剤は優れた抗癌活性を示すが、至適投与量がアドリアマイシンに比べかなり高くなっていた。

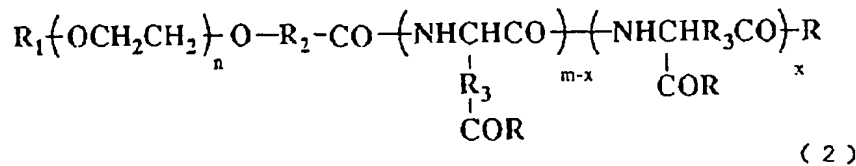
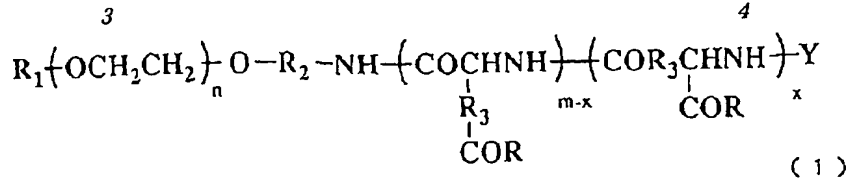
【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前記水溶性高分子化抗癌剤の抗癌活性を改良するために鋭意検討した結果本発明を完成した。

【0005】 即ち、本発明は、(1)式(1)、(2)またはこれらの塩の構造を有するブロック共重合体と、アドリアマイシンとの複合体からなる水溶性抗癌剤、

【0006】

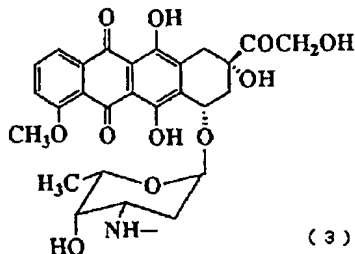
【化3】



【0007】(式中、 R_1 は水素または低級アルキル基を表し、 R_2 は結合基を表し、 R_3 はメチレン基またはエチレン基を表し、 Y は水素または保護基を表し、また R はそれぞれ独立して水酸基または式(3)の構造を有するアドリアマイシンの残基を表すものとし、 n は5~1,000、 m は2~300、 x は0~300の整数を示すが、 x は m より大きくないものとする。)

【0008】

【化4】



【0009】(2) ブロック共重合体が、ポリエチレングリコール構造部分を外側に、ポリアミノ酸またはその塩構造部分を内側とするミセルを形成し、ミセル内にアドリアマイシンを含有するものである上記(1)記載の水溶性抗癌剤、(3) R_1 がメチル基である上記(1)または(2)記載の水溶性抗癌剤、(4) R_2 が炭素数2~4のアルキレン基である上記(1)、(2)または(3)記載の水溶性抗癌剤、(5) R_3 がメチレン基である上記(1)、(2)、(3)または(4)記載の水溶性抗癌剤、に関する。

【0010】本発明の水溶性抗癌剤は高い薬理効果を有する。

【0011】以下、本発明について詳細に説明する。

【0012】前記式(1)または(2)において、 R_1 は水素または低級アルキル基を表すが、好ましいものはメチル基である。 R_2 は本発明の水溶性抗癌剤の水溶性を損なわない限り(好ましくは、さらに本発明の水溶性

抗癌剤のミセル形成能を損なわない限り)、特に限定されず、ポリエチレングリコール構造部分の末端にポリアミノ酸構造部分を形成させる際、ポリエチレングリコール構造部分を構成することになる化合物の末端を該形成に適した構造に変換させるために使用した方法及び化合物に対応した構造をとる。例えばメチレン基($-CH_2-$)、エチレン基($-CH_2CH_2-$)、プロピレン基($-CH(CH_3)CH_2-$)、トリメチレン基($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$)、イソブチレン基($-CH_2CH(CH_3)CH_2-$)等の炭素数1~8、好ましくは炭素数1~4のアルキレン基等が挙げられる。ポリアミノ酸の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられるが、特に限定されるものではない。前記式(1)において、 Y は水素または保護基を表し、保護基としてはアセチル基等が挙げられるが、特に限定されない。

【0013】水溶性抗癌剤に用いられるブロック共重合体は、水溶性である限りその分子量は特に限定されないが、好ましくは1,000~100,000、特に好ましくは5,000~50,000である。ブロック共重合体中の、ポリエチレングリコール構造部分とアドリアマイシンを結合せしめたポリアミノ酸構造部分の割合は、ブロック共重合体の水溶性が保たれる限り特に限定されないが、好ましくは1:0.1~10(重量比)、特に好ましくは1:0.2~5(重量比)である。また、 n は5~1,000であるが好ましくは15~400であり、 m は2~300であるが好ましくは10~100であり、 x は0~300であるが好ましくは0~100である。ブロック共重合体に結合させるアドリアマイシンの量は特に限定されないが、通常ブロック共重合体中の量が3~80重量%となる量であり、好ましくは5~60重量%となる量である。ブロック共重合体に結合しているアドリアマイシンの量と結合していないアドリアマイシンの量の比は特に限定されないが、通常1:0.01~10(重量比)であり、好ましくは1:0.

1~2である。

【0014】ブロック共重合体におけるアドリアマイシンを結合せしめる担持用担体は種々の方法により製造することができる。例えばポリエチレングリコールまたはその末端を化学修飾したものにポリアミノ酸を反応させ、その後保護基を含むものは保護基を除去することにより、またはポリエチレングリコールまたはその末端を化学修飾したものと重合性アミノ酸またはアミノ酸誘導体モノマーを反応させ、保護基を含むものは保護基を除去することにより担持用担体が得られる。

【0015】ポリエチレングリコールの末端の化学修飾は、公知の方法によって行うことができ、例えば水酸基をアミノ基に変換する方法として、エチレンジアミンを反応させる方法、アクリロニトリルやメタクリロニトリルをマイケル付加後、ニトリル基を還元しアミノ基に変換する方法、水酸基をハロゲン基に置換した後、エタノールアミン等のアルコールアミンを反応する方法、または水酸基を直接ニトリルに変換後、還元しアミノ基に変換する方法等を行うことができる。また、水酸基をカルボキシル基に変換する方法として、通常酸化反応、縮合

反応、付加反応、加水分解反応、またはこれらを組み合わせた反応等を採用できる。例えば、水酸基を金属ナトリウムでアルコールとした後、プロモ酢酸エチル等のハロゲン化脂肪酸エステルを付加し、その後加水分解する方法で水酸基をカルボキシル基に変換することができる。

【0016】また、保護基を除去する方法は、アルカリによる方法、酸による方法及び還元法で可能である。アルカリ法で用いるアルカリ性物質としては、カセイソーダ、カセイカリ、ヒドラジン、アンモニア等通常のアルカリ性物質を用いることができる。酸法で用いる酸性物質としては、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸、フッ化水素酸、臭化水素酸、塩化水素酸等の通常の酸性物質を用いることができる。また副反応を防止するため、アニソール、チオアニソール、m-クレゾール、o-クレゾール等を加えることもできる。還元法としては、接触還元法、接触水素移動還元法等一般的な方法を用いることができる。

【0017】また、ポリアミノ酸構造部分が、末端にアミノ基を有する場合、末端アミノ基を修飾したものを担持用担体として用いることもできる。修飾法としては酸無水物または酸ハロゲン化物等を用いる方法が挙げられる。修飾は保護基を除去する前でも後でもどちらでも可能である。

【0018】このようにして得られる担持用担体に必要によりアドリアマイシンを反応させることにより本発明で用いられるブロック共重合体を得られる。例えば式

(1)のブロック共重合体でアドリアマイシンが結合したものを得るには、式(1)においてすべてのRが水酸

基である担持用担体にアドリアマイシンを反応させればよい。担持用担体にアミド結合でアドリアマイシンを結合させる際、反応はペプチド結合生成法として知られる常法に準じて行うことができる。例えば、酸ハロゲン化物法、酸無水物法、カップリング法等が使用できるが、縮合剤を使用するカップリング法が望ましい。縮合剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC·HCl)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)等が使用できる。縮合剤はアドリアマイシンに対して0.5~20倍モル用いるのが好ましく、特に1~10倍モル用いるのが好ましい。またこの際、N-ヒドロキシサクシニイミド(HONSu)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)等を共存させてもよい。

【0019】アドリアマイシンの使用量は特に限定されないが、通常担持用担体のカルボキシル基1当量に対し、0.1~2モル用いる。

【0020】縮合反応は溶媒中で行うのが好ましく、溶媒としては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、水及びそれらの混合溶媒等種々のものが使用でき、特に限定されない。溶媒の使用量は特に限定されないが、通常担持用担体に対して10~500重量倍用いる。

【0021】縮合反応は、-10~40℃で行うのが好ましく、特に、-5~30℃で行うのが好ましい。反応は2~48時間行えば充分である。

【0022】本発明で用いられるブロック共重合体に、アドリアマイシンを添加した後、適当な処理をすることにより、本発明の水溶性抗癌剤が得られる。あるいはアドリアマイシンを添加する代わりに、縮合反応の条件により、すなわちアドリアマイシンの量を多めにする、縮合剤の量を少なめにする、反応時間を短くするといった方法により、未反応のアドリアマイシンを残した後、適当な処理をすることにより得ることもできる。

【0023】処理の方法としては、縮合反応液にアドリアマイシンまたはアドリアマイシンの溶液を添加したもの、あるいは未反応のアドリアマイシンを残した縮合反応液を透析、限外濾過することにより、水溶液とする方法が挙げられる。あるいは縮合反応液をイソプロピルエーテル(IPF)等の貧溶媒で沈析した後適当な溶媒に溶解したもの、もしくはブロック共重合体を適当な溶媒に溶解したものにアドリアマイシンまたはアドリアマイシンの溶液を添加し、透析、限外濾過してもよい。ある

7

いは縮合反応液を透析、限外濾過した後、アドリアマイシンまたはアドリアマイシンの溶液を添加し、再度透析、限外濾過してもよい。ブロック共重合体とアドリアマイシンを混合する際用いる溶媒としては、ブロック共重合体とアドリアマイシンを共によく溶解するものが好ましい。例えばDMF、DMFと水の混合溶媒等が挙げられる。また、ブロック共重合体とアドリアマイシンを混合する際、超音波照射等の処理を行ってもよい。

【0024】限外濾過を行った後でも、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンが存在すること
10は、種々の分析手段により確認できる。例えば、液体クロマトグラフ、質量分析等の手段が挙げられる。定量することも可能である。

【0025】以下に、ポリエチレングリコール構造部分とポリアスパラギン酸構造部分とからなる担持用担体で、アドリアマイシンをポリアスパラギン酸の側鎖に結合させたブロック共重合体にアドリアマイシンを添加した水溶性抗癌剤を例にとり、その合成法を詳しく述べる。

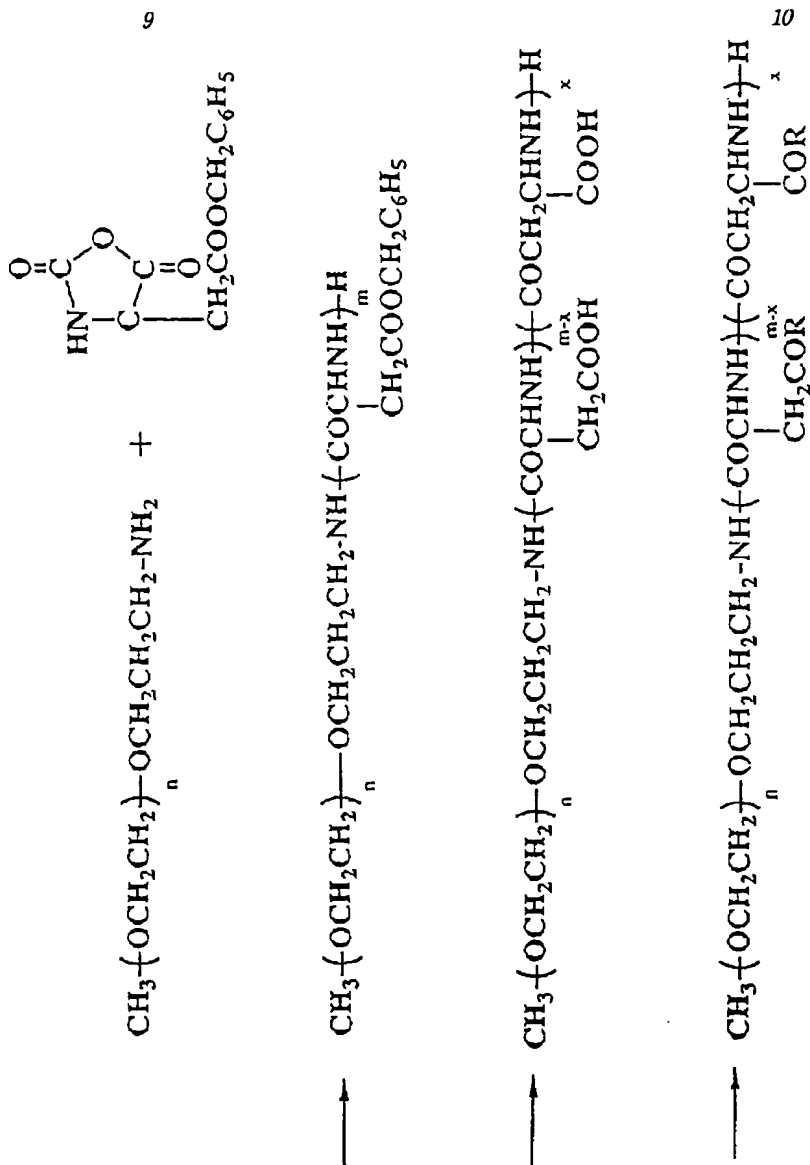
【0026】この水溶性抗癌剤に用いるブロック共重合 20

8

体の合成は、以下の反応式に示すごとくβ-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(BLA-NCA)を、片末端にメトキシ基を有し、他の片末端に3-アミノプロピル基を有するポリエチレングリコール(PEG-NH₂)を開始剤として、DMF、DMSO、ジオキサン、クロロホルム、THF、アセトニトリル等の溶媒中で開環重合させ、ポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)ブロック共重合体(PEG-PBLA)を得、次いでこのPEG-PBLAのベンジルエステルを加水分解してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体(PEG-P(Asp.))を得る。このPEG-P(Asp.)に抗癌剤のアドリアマイシンとEDC、DCC等の縮合剤を加え、溶液中で反応させることにより、アドリアマイシンの一級アミノ基とポリアスパラギン酸のカルボキシル基とをアミド結合で結合させたブロック共重合体(PEG-P(Asp.)ADRを得る。

【0027】

【化5】

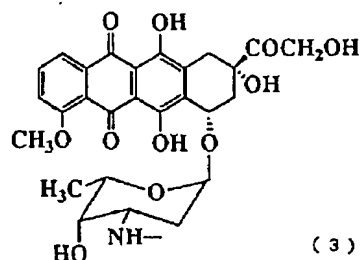


(4)

【0028】(式中、Rは水酸基あるいは式(3)を表し、nは5~1,000、mは2~300、xは0~300の整数を示すが、xはmより大きくないものとする。)

【0029】

【化6】



【0030】縮合反応液を透析、限外濾過し、アドリアマイシン換算で20mg/ml程度の水溶液とし、アドリアマイシンのDMF溶液を添加し、10分間超音波照射を行い、その後再度透析、限外濾過を行うことにより、本発明の水溶性抗癌剤を得ることができる。あるいは

は縮合反応液をIPEで沈析した後DMFに溶解し、アドリアマイシンのDMF-水混合溶液を添加し、10分間超音波照射を行い、透析、限外濾過を行っても得ることができる。

【0031】本発明の水溶性抗癌剤は高いアドリアマイシン含量にもかかわらず良好な水溶性を有しており、凍結乾燥したり濃縮してもその水溶性は保たれている。

【0032】この水溶性抗癌剤の抗癌活性は、表1に示すように元のアドリアマイシン自体よりも高いものである。しかもその高い抗癌活性はアドリアマイシンよりも少ない副作用の範囲でも達成される。また特開平2-300133号公報に記載されている水溶性高分子化抗癌剤に比べ、少ない投与量で同等の抗癌活性を示している。

【0033】本発明の水溶性抗癌剤は、一般的に使用される種々の剤型、例えば固形剤、軟膏、液剤などの形で使用しうるが、通常注射剤として使用され、その投与量は、1週間当たり1~3回投与で、総量50~1,000mg/m² 週程度である。

【0034】

【実施例】次に実施例により本発明を具体的に説明する。

【0035】実施例1

β-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(BLA-NCA) 7.1gをN,N-ジメチルホルムアミド(DMF) 70mlに溶解した。片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール(PEG-NH₂) (分子量5,100) 5.0gをDMF 50mlに溶解し、その溶液をBLA-NCA溶液に加えた。40時間後に反応混合物をイソプロピルエーテル(IPE) 1,000mlに滴下して沈澱したポリマーを濾過で回収し、IPEで洗浄した後に真空乾燥してポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)ブロック共重合体(PEG-PBLA) 9.3gを得た。PEG-PBLA 7.0gを0.5N水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解した。ポリマーが溶解した後、酢酸でpHを酸性とし、ADVANTEC UK-10 (分画分子量=10,000)の限外濾過膜で限外濾過した。濃縮液を凍結乾燥してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体(PEG-P(Asp.)) 5.1gを得た。このPEG-P(Asp.) 1,230mgを水15mlに溶解した。アドリアマイシン塩酸塩1,500mgをDMF 150mlに懸濁し、氷冷下トリエチルアミン353μlを加えた後PEG-P(Asp.)水溶液を加えた。この混合溶液にN-ヒドロキシサクシニミド375mg、および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC) 525μlを加え、氷冷下4時間反応させた。その後EDC 525μlを追加し室温で18

時間反応させた。反応後、反応混合液中には全アドリアマイシンに対して2.5%の未反応のアドリアマイシンが残っていた。反応混合液をシリカゲルカラム(ワコーゲルC-100)およびイオン交換樹脂(強酸性イオン交換樹脂PK-216)を用いて精製し、未反応のアドリアマイシン等の低分子物質を除去した。精製後の液を透析膜(分画分子量=12,000)を用いて0.1M酢酸中で3時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画分子量=50,000)の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で20mg/ml (紫外分光光度計で485nmの吸収より算出)の水溶液35mlを得た。得られたPEG-P(Asp.)ADRは前記式(1)の構造を有し、R₁はメチル基、R₂はトリメチレン基、R₃はメチレン基、Yは水素を表す。n=115、m=20、x=4でRの一部は水酸基で残りは前記残基式(3)である。アドリアマイシン含有率は47重量%であるが良好な水溶性を示した。このPEG-P(Asp.)ADRの20mg/ml (アドリアマイシン換算)の水溶液10mlにアドリアマイシン塩酸塩20mg、トリエチルアミン5μlをDMF 20mlに溶解した溶液を添加し、10分間の超音波照射を行った後、透析膜(分画分子量=12,000)を用いて0.01M酢酸中で3時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画分子量=50,000)の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で20mg/ml (紫外分光光度計で485nmの吸収より算出)の水溶液10.2mlを得た。液体クロマトグラフによる分析の結果、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの量は全アドリアマイシン中の8.5%であった。このものも元のPEG-P(Asp.)ADRと同様良好な水溶性を示した。

【0036】実施例2

実施例1で得たPEG-P(Asp.)ADRの20mg/ml (アドリアマイシン換算)の水溶液10mlにアドリアマイシン塩酸塩50mg、トリエチルアミン12μlをDMF 20mlに溶解した溶液を添加し、10分間の超音波照射を行った後、透析膜(分画分子量=12,000)を用いて0.01M酢酸中で3時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画分子量=50,000)の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で20mg/ml (紫外分光光度計で485nmの吸収より算出)の水溶液11.5mlを得た。液体クロマトグラフによる分析の結果、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの量は全アドリアマイシン中の18.4%であった。このものも元のPEG-P(Asp.)ADRと同様良好な水溶性を示した。

【0037】実施例3

β-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無

水物 (BLA-NCA) 6.4 g を N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 60 ml に溶解した。片末端メトキシ基片末端 3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (PEG-NH₂) (分子量 5,100) 3.0 g を DMF 30 mg に溶解し、その溶液を BLA-NCA 溶液に加えた。40 時間後に反応混合物をイソプロピルエーテル (IPE) 700 ml に滴下して沈殿したポリマーを濾過で回収し、IPE で洗浄した後に真空乾燥してポリエチレングリコール-ポリ (β-ベンジル-L-アスパルテート) ブロック共重合体 (PEG-PBLA) 7.2 g を得た。PEG-PBLA 5.0 g を 0.5 N 水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解した。ポリマーが溶解した後、酢酸で pH を酸性とし、ADVANTEC UK-10 (分画分子量 = 10,000) の限外濾過膜で限外濾過した。濃縮液を凍結乾燥してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (PEG-P (Asp.)) 3.1 g を得た。この PEG-P (Asp.) 1,010 mg を水 15 ml に溶解した。アドリアマイシン塩酸塩 1,500 mg を DMF 150 ml に懸濁し、氷冷下トリエチルアミン 353 μl を加えた後 PEG-P (Asp.) 水溶液を加えた。この混合溶液に N-ヒドロキシサクシニミド 375 mg、および 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 525 μl を加え、氷冷下 4 時間反応させた。その後 EDC 525 μl を追加し、室温で 18 時間反応させた。反応後、反応混合液中には全アドリアマイシンに対して 2.3% の未反応のアドリアマイシンが残っていた。反応混合液をシリカゲルカラム (ワコーゲル C-100) およびイオン交換樹脂 (強酸性イオン交換樹脂 PK-216) を用いて精製し、未反応のアドリアマイシン等の低分子物質を除去した。精製後の液を透析膜 (分画分子量 = 12,000) を用いて 0.1 M 酢酸中で 3 時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画分子量 = 50,000) の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で 20 mg/ml (紫外分光光度計で 485 nm の吸収より算出) の水溶液 37 ml を得た。得られた PEG-P (Asp.) ADR は前記式 (1) の構造を有し、R₁ はメチル基、R₂ はトリメチレン基、R₃ はメチレン基、Y は水素を表す。n = 115、m = 30、x = 6 で R の一部は水酸基で残りは前記式 (3) である。アドリアマイシン含有率は 5.4 重量% であるが良好な水溶性を示した。この PEG-P (Asp.) ADR の 20 mg/ml (アドリアマイシン換算) の水溶液 10 ml にアドリアマイシン塩酸塩 15 mg、トリエチルアミン 4 μl を DMF 20 ml に溶解した溶液を添加し、10 分間の超音波照射を行った後、透析膜 (分画分子量 = 12,000) を用いて 0.01 M 酢酸中で 3 時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画

分子量 = 50,000) の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で 20 mg/ml (紫外分光光度計で 485 nm の吸収より算出) の水溶液 9.8 ml を得た。液体クロマトグラフによる分析の結果、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの量は全アドリアマイシン中の 5.5% であった。このものも元の PEG-P (Asp.) ADR と同様良好な水溶性を示した。

【0038】実施例 4

10 実施例 3 で得た PEG-P (Asp.) ADR の 20 mg/ml (アドリアマイシン換算) の水溶液 10 ml にアドリアマイシン塩酸塩 50 mg、トリエチルアミン 12 μl を DMF 20 ml に溶解した溶液を添加し、10 分間の超音波照射を行った後、透析膜 (分画分子量 = 12,000) を用いて 0.01 M 酢酸中で 3 時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50 (分画分子量 = 50,000) の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、アドリアマイシン換算で 20 mg/ml (紫外分光光度計で 485 nm の吸収より算出) の水溶液 10.5 ml を得た。液体クロマトグラフによる分析の結果、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの量は全アドリアマイシン中の 14.4% であった。このものも元の PEG-P (Asp.) ADR と同様良好な水溶性を示した。

【0039】実施例 5

30 実施例 3 で得た PEG-PBLA 2.0 g を 0.5 N 水酸化ナトリウムに懸濁しながら室温でベンジルエステルを加水分解した。ポリマーが溶解した後、酢酸で pH をほぼ中性とし、アミコン YM-1 (分画分子量 = 1,000) の限外濾過膜で限外濾過した。限外濾過を続けながら、0.05 N 塩酸で洗浄し、さらに水洗を充分に行った。濃縮液を凍結乾燥してポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (PEG-P (Asp.)) 1.3 g を得た。この PEG-P (Asp.) 100 mg を DMF 10 ml に溶解し、氷冷下アドリアマイシン塩酸塩 71.2 mg、トリエチルアミン 27.3 μl、および 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl) 67.2 mg を加え 4 時間反応させた。さらに室温で 20 時間反応させた。反応後、反応混合液中には未反応のアドリアマイシンはほとんど残っていなかった。反応混合液をイソプロピルエーテル (IPE) 100 ml に滴下して沈殿したポリマーを濾過で回収し、IPE で洗浄した後真空乾燥した。水に溶解し、アミコン YM-3 (分画分子量 = 1,000) の限外濾過膜で限外濾過した。限外濾過を続けながら、水、メタノール、酢酸の混合液で洗浄し、さらに水洗を充分に行った後濃縮して、固形分重量で約 50 mg/ml (一部を凍結乾燥してその重量より算出) の水溶液 3.1 ml を得た。得られた PEG-P (Asp.) ADR は前記式 (1) の構

15

造を有し、 R_1 はメチル基、 R_2 はトリメチレン基、 R_3 はメチレン基、 Y は水素を表す。 $n=115$ 、 $m=30$ 、 $x=6$ で R の一部は水酸基で残りは前記式(3)である。アドリアマイシン含有率は40%であるが良好な水溶性を示した。このPEG-P (A s p.) ADRの50mg/ml (固形分)の水溶液1mlにアドリアマイシン塩酸塩10mg、トリエチルアミン2.5 μ lをDMF10mlに溶解した溶液を添加し、10分間室温で攪拌した後、透析膜(分画分子量=12,000)を用いて水中で3時間透析した。透析後、ADVANTEC UK-50(分画分子量=50,000)の限外濾過膜で限外濾過した。水洗と濃縮を繰り返し、2mlの水溶液を得た。液体クロマトグラフによる分析の結果、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの量は全アドリアマイシン中の18%であった。このものも元のPEG-P (A s p.) ADRと同様良好な水溶性を示した。

【0040】応用例1

CDF1メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌Colon 26細胞を移植し、腫瘍の体積が100mm³前後に達した時点から実施例1、2、3または4で得られた水溶性抗癌剤、または実施例1および2または3お

16

よび4に対応する抗癌剤(フリーのアドリアマイシン塩酸塩)を添加しないPEG-P (A s p.) ADR、またはアドリアマイシン塩酸塩を4日間隔1回、計3回静脈内に投与し、進行癌に対する効果を検討した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。また投与量はすべて全アドリアマイシンの量に換算して用いた。薬剤の抗腫瘍効果は、腫瘍消失マウス数と腫瘍増殖曲線から判定した。結果を表1と図1~7に示す。図から明らかなように、アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合、移植した腫瘍の増殖抑制効果は認められるが腫瘍の縮小はほとんど認められないのに対し、本発明の水溶性抗癌剤を投与した場合、移植した腫瘍の増殖抑制効果に優れ、移植した腫瘍が消失したケースも認められた。また、投与量については、ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの割合が増えるに従って、低い投与量で抗癌活性が見られた。また、毒性の一つの指標である体重減少については、本発明の水溶性抗癌剤はアドリアマイシンに比べ低い体重変化の範囲でも、腫瘍の消失が見られるマウスが存在した。

【0041】

【表1】

表1 マウス大腸癌 Colon 26 に対する抗癌活性

サンプル	非結合 (%)	投与量 (mg/kg)	腫瘍消失マウス	体重変化 (%)
ADR・HC1		5	0/3	- 4.5
		10	0/3	-11.3
実施例1の 水溶性抗癌剤	8.5	25	0/3	- 8.1
		50	1/3	- 6.0
		100	2/3	- 4.1
		200	2/3	-14.4
実施例2の 水溶性抗癌剤	18.4	12.5	1/3	+ 1.5
		25	0/3	- 0.4
		50	0/3	- 5.5
		100	0/3	-23.4
実施例1, 2*	-	25	0/3	- 5.1
		50	0/3	-13.6
		100	0/3	- 3.2
		200	0/3	- 2.4
実施例3の 水溶性抗癌剤	5.5	25	0/3	- 6.0
		50	0/3	- 5.1
		100	1/3	+ 1.0
		200	2/3	- 1.5
実施例4の 水溶性抗癌剤	14.4	12.5	0/3	- 4.4
		25	0/3	+ 2.3
		50	0/3	- 2.3
		100	2/3	-13.2
実施例3, 4*	-	25	0/3	- 0.7
		50	0/3	-14.7
		100	0/3	- 8.9
		200	0/3	- 2.4

非結合 (%) ブロック共重合体に結合していないアドリアマイシンの
全アドリアマイシンに対する比率

体重変化 (%) 投与後10日目における体重の0日目との比較

ADR・HC1 アドリアマイシン塩酸塩

実施例1, 2* 実施例1および2に対応する抗癌剤（フリーのアドリアマイシン
塩酸塩）を添加しないPEG-P (A s p.) ADR

実施例3, 4* 実施例3および4に対応する抗癌剤（フリーのアドリアマイシン
塩酸塩）を添加しないPEG-P (A s p.) ADR

【0042】

【発明の効果】本発明の水溶性抗癌剤は、良好な水溶性を有し、しかも遊離のアドリアマイシンに比較して低い毒性の範囲でも高い抗腫瘍効果を示す。また、従来の水溶性高分子化抗癌剤に比べ、低い投与量で同等の抗癌活性を示すことより、本発明により極めて有用な医薬を提供できるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

【図2】実施例1の水溶性抗癌剤を投与した場合の、マ

ウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

【図3】実施例2の水溶性抗癌剤を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

【図4】実施例1および2に対応する抗癌剤（フリーのアドリアマイシン塩酸塩）を添加しないPEG-P (A s p.) ADRを投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

【図5】実施例3の水溶性抗癌剤を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

【図6】実施例4の水溶性抗癌剤を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線。

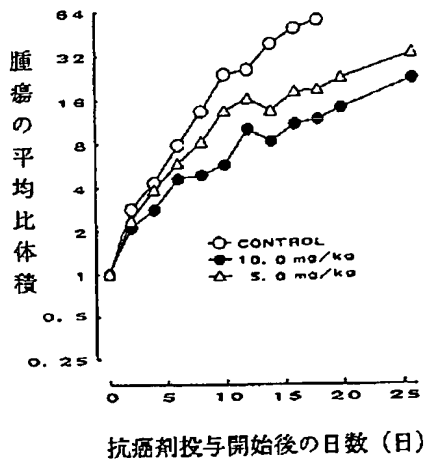
19

【図7】実施例3および4に対応する抗癌剤（フリーのアドリアマイシン塩酸塩）を添加しないPEG-P（A

【図1】

図 1

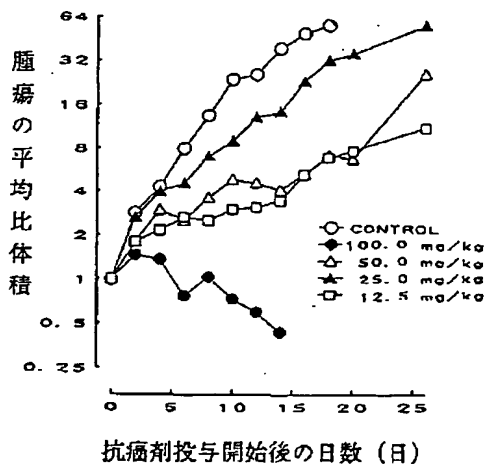
アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合



【図3】

図 3

実施例2の水溶性抗癌剤を投与した場合



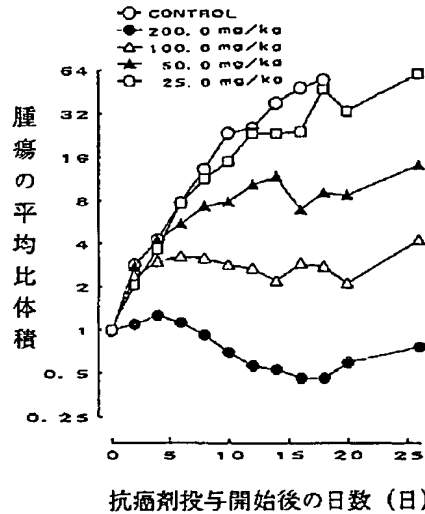
20

s p.) ADRを投与した場合の、マウス大腸癌C o l o n 26の腫瘍増殖曲線。

【図2】

図 2

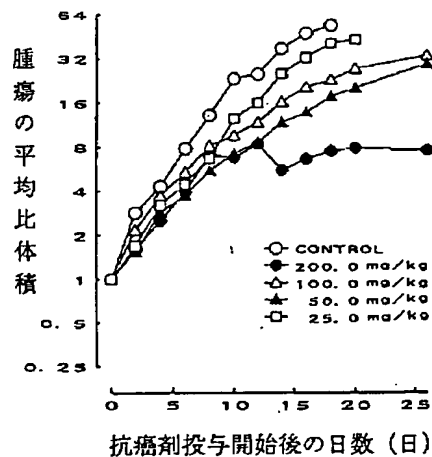
実施例1の水溶性抗癌剤を投与した場合



【図4】

図 4

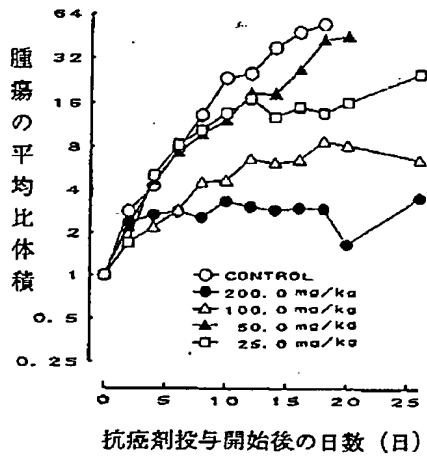
実施例1および2に対応する抗癌剤を添加しないPEG-P（A s p. ）ADRを投与した場合



【図5】

図 5

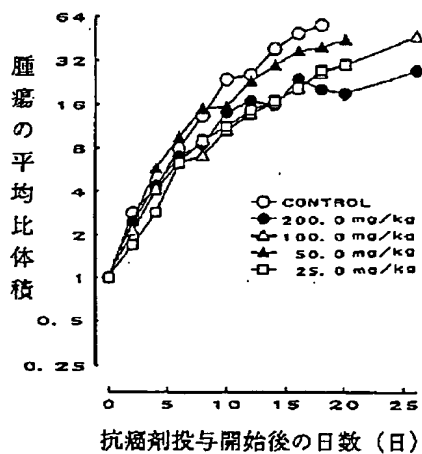
実施例3の水溶性抗癌剤を投与した場合



【図7】

図 7

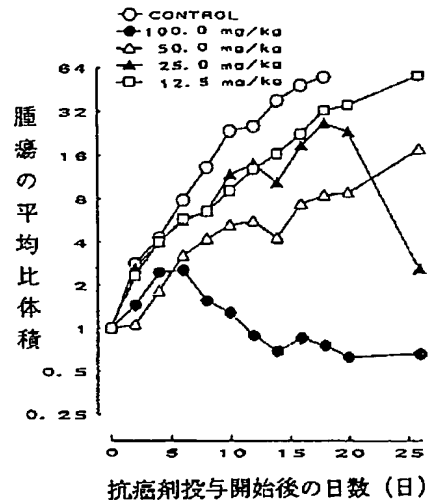
実施例3および4に対応する抗癌剤を添加しない
PEG-P (Asp.) ADRを投与した場合



【図6】

図 6

実施例4の水溶性抗癌剤を投与した場合



フロントページの続き

(72)発明者 片岡 一則
千葉県柏市大室1083-4、柏ビレジ141-9
(72)発明者 岡野 光夫
千葉県市川市国府台6-12-12
(72)発明者 桜井 靖久
東京都杉並区永福3-17-6
(72)発明者 ▲勢▼藤 隆
群馬県前橋市下川町45-3

(72)発明者 福島 重人
群馬県高崎市岩鼻町239
(72)発明者 山田 好美
群馬県多野郡新町1393-2
(72)発明者 浴本 久雄
東京都北区志茂2-11-1-803
(72)発明者 岡本 一也
東京都荒川区東尾久5-7-10-305
(72)発明者 真柴 洋子
東京都北区志茂3-29-11